



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0078542 호
Application Number 10-2003-0078542

출 원 년 월 일 : 2003년 11월 07일
Date of Application NOV 07, 2003

출 원 인 : 왕성호
Applicant(s) WANG, SUNG-HO

2004 년 11 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

4.유명] 특허출원서
 5.리구분] 특허
 6.신처] 특허청장
 7.출원자] 2003.10.29
 8.명의 명칭] 인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한 건강기능식품의 원료 및 성분으로 개발된 정제목초액
 9.명의 영문명칭] The Clinical Application of Plant Vinegar by Natural Antioxidant
 10.출원인] 바이오 오키(주)
 11.명칭] 바이오 오키(주)
 12.출원인코드] 1-1998-103560-2
 13.명지] 왕성호
 14.성명의 국문표기] WANG,SUNG HO
 15.성명의 영문표기] 591109-1229015
 16.주민등록번호] 407-310
 17.주소] 인천광역시 계양구 오류동 용종동 216-5
 18.국적] KR
 19.사청구] 청구
 20.지] 특허법 제42조의 규정에 의한 출원. 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 출원인 바이오 오키(주) (인)
 21.수수료] 20 면 29,000 원
 22.기본출원료] 5 면 5,000 원
 23.가산출원료] 0 건 0 원
 24.우선권주장료] 2 항 173,000 원
 25.합계] 207,000 원
 26.감면사유] 소기업 (70%감면)
 27.감면후 수수료] 62,100 원
 28.부서류] 1. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】

1약】

본 반명은 침엽수, 활엽수, 대나무 등의 목재를 열분해시켜 얻어진 기초 목초액로부터 유해성분을 제거한 경제 목초액을 인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한 강기능식품의 원료 및 성분으로 사용하기 위한 것으로, 경제 목초액의 인체안전성, 결과와 경제 목초액의 항산화 기능 성분 규명 및 경제 목초액의 항산화 기능 평가 결과, 경제 목초액이 나이가 들어가면서 체내에 생성되어 노화의 촉진, 종 종양, 체내의 대사이상등을 유발하는 유해산소의 공격으로부터 몸을 보호하는 강기능식품의 원료 또는 성분으로서 매우 유용하게 사용될수 있다는 것을 제시하기 함이다.

4인어】

4 목초액, 천연 항산화제, 항산화 활성, 건강 기능 식품

【명세서】

발명의 명칭]

인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한 건강 기능 식품의 원료 및 성분으로 개발
경제 목초액 [The Clinical Application of Plant Vinegar by Natural Antioxidant]

발명의 상세한 설명]

발명의 목적]

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 경제 목초액을 인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한 건강 기능식품
원료 및 성분으로 사용하기 위한 것으로, 더욱 상세하게는 경제 목초액을 건강 기
식품의 원료 및 성분으로 사용하기 위해서, 인체의 안전성 여부를 평가하고 경제
목초액에 함유 되어있는 페놀 화합물중에 구아이 알콜 (Guaiacol) 및 구아이 알콜 유
체 (Guaiacol Related) 와 시링콜 (Syringol) 및 시링콜 유사체 (Syringol Related)을
항산화 기능성분으로해서, 노화의 촉진, 각종 종양, 체내의 대사이상등을 유발하는
해산소의 공격으로부터 몸을 보호하는 건강 기능 식품의 원료 및 성분으로 경제 목
초액을 이용하기 위한 것이다.

모든 생체 활동에 필요한 에너지의 생산은 음식물의 영양소가 호흡으로 인하여
내로 유입된 산소와 결합하는 대사의 반박으로, 이상적인 대사는 영양소 와 산소의
리화학적 균형에 기인한다.그러나 이러한 균형을 깨트리는 원인 중, 대기의 오염,
도한 운동 및 음주, 흡연, 과식, 정신적 압박감등의 유발요인 등으로 인하여 대사

정중의 산소의 생화학적 상태는 매우 불안정한 상태로 바뀌게 되는데, 이를 유해소(free radical)라고 한다.

정상적인 산소에 비해 유해산소는 체내에서 머무는 시간은 매우 짧지만, DNA 손과 체내의 효소들 불활성화시켜 대사이상을 유발하고, 세포 와 호르몬등에 대단히 영향을 끼쳐 동맥경화와 같은 심혈관계질환, 백내장이나 관절염처럼 신경조직의 화학적 노화를 유발하는 근골격계의 질환, 또는 각종의 악성종양등을 초래 할 뿐만 아니라 노화를 촉진한다. 따라서, 우리 몸 안에는 체내에서 생성된 유해산소를 제거기 위해서, SOD(슈퍼옥사이드 디스뮤타아제 : superoxide dismutase), GPO(글루타온 퍼옥시다아제 : glutathione peroxidase), 카탈라아제(catalase) 와 같은 항산화 효소 와 비타민 C 나 E와 같은 항산화 물질이 체내에 존재해 유해 산소의 공격을 막 주고 있다.

우리 몸은 나이가 들어가면서, SOD(슈퍼옥사이드 디스뮤타아제 : superoxide smutase), GPO(글루타치온 퍼옥시다아제 : glutathione peroxidase), 카탈라아제atalase)와 같은 항산화 효소의 활성이 저하되고, 비타민 C 나 E와 같은 항산화 물의 함유량이 낮아지면서, 체내의 유해 산소의 공격을 억제 할 수 없어서, 죽어가는 세포의 속도가 새로 생겨나는 세포의 속도를 뒤따르지 못해 장기와 조직의 노화가 행된다. 또한 최근엔 각종 공해 등 환경요인으로 생체내 유해산소의 생성과 제거의 형이 많이 깨어지고 있어 항산화 성분을 외부로부터 체내로 보급하는 것이 매우 중요하다.

지금까지 개발된 합성 항산화 물질로는 BHA (butylated hydroxy anisole),

T (butylated hydroxy toluene) 및 NDGA (nordihydro-guaiaretic acid) 등이 있으며 천연 항산화 물질로는 SOD (슈퍼옥사이드 디스뮤타아제 : superoxide dismutase), 옥시다아제 (peroxidase), 카탈라아제 (catalase), GPO (글루타치온 퍼옥시다아제 glutathione peroxidase) 등의 항산화 효소 와 토코페롤 (비타민 E), 비타민 C (vitamin C, ascorbic acid), 카로티노이드 (Carotenoid), 글루타티온 (glutathione) 등 비효소적 항산화물질 등이 있다. 그러나 합성 항산화제는 간비대, 간의 microsome 활성 증가, 체내에 흡수물질의 일부가 독성을 혹은 알러지를 유발시킬수 있으며, 온도에 약해 한번 열을 가하면 쉽게 파괴되는 단점이 있다 (Shahi, F. and nasundara, P. Phenolic antioxidants Critical Review in Food Science and Nutrition (1992)). 반면에 천연 항산화제는 합성 항산화제에 비해 인체에 안전하다는 장점이 있으나, 그 효과가 약하다는 단점이 있다. 따라서 항산화 능력이 탁월하고 인체에 안전한 새로운 천연 항산화 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다.

목초액은 일본의 명치시대, 청일전쟁 전부터 이용되기 시작 하였으나, 이용목적 목초액의 주성분인 초산의 제조였기 때문에, 그 후 초산이 합성화학에 의해 순도 높은 제품을 쉽게 싼 값에 생산하게 됨으로써, 목초액의 이용은 거의 사라지게 되었다. 2차 대전 전후 목초액의 이용은 재개되었으나, 현재까지 그 이용법은 목초액에 함유된 성분들의 이용이 아니고, 목초액의 특유의 냄새, 색깔을 그대로 이용하는 것으로서, 예를들면 목초액의 연기 냄새 (Smoke Flavours)를 그대로 이용해서 햄, 베이컨, 소세지 등의 제조에 있어 훈연의 효과를 대신 할수 있게 사용하거나, 절구워진 고기나 고기등의 색깔을 연출하는 식품 첨가물로 그 이용 방법이 매우 단순하였다.

일본에서도 목초액을 건강 식품 원료로 이용하여, 무좀이나 아토피성 피부염, 노병, 간염등의 증상을 개선하려는 시도가 있었으나, 목초액에 함유되어 있는 유해분(타르, 메탄올, 벤조피렌, 페틸콜란스렌 등)들의 존재로 인체에 대한 안전성이 보되지 않아서, 건강식품제조업체, 의약품제조업체에 주목을 받지 못하고 있다.

본 발명자들은 목초액을 건강에 유익한 성분으로 사용하기 위해서 목초액의 유해성분을 제거하는 기술을 대한민국 특허청으로부터 특허로 인정을 받았고 (등록번호 00290986 '기초 목초액에 함유된 유해성분 제거 방법', 등록번호 100212472 '기초 초액에 함유된 유해성분의 제거 방법'), 동 방법으로 생산된 경제 목초액을 인체의 산화 기능을 증진시키기 위한 건강기능식품의 원료 및 성분으로 사용하기 위해서, 성 평가를 통해서 경제 목초액이 인체에 안전하다는 사실을 확인함과 동시에, 경제 초액의 항산화 기능 성분 규명과 경제 목초액의 인체의 항산화 기능 증진 평가들 해서 경제 목초액이 매우 우수하게 유해 산소를 제거한다는 사실을 확인하였기에 발명의 완성에 이르게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 경제 목초액을 건강에 유익한 성분으로 사용하기 위해서, 목초액의 해성분을 제거한 경제 목초액을 '등록번호 100290986 기초 목초액에 함유된 유해성

제거 방법', '등록번호 100212472 기초 목초액에 함유된 유해성분의 제거 방법'에
라 제공한다.

등 방법으로 제공된 정제 목초액을 인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한 건강
능식품의 원료 및 성분으로 사용하기 위해서, 정제 목초액에 대한 인체의 안전성
가 와 정제 목초액의 항산화 기능 성분 규명 및 정제 목초액의 인체에 대한 항산화
능 평가를 수행한다.

발명의 구성 및 작용]

상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 등록 특허 0290986 와 등록 특
0212472의 방법을 사용하여 기초 목초액에 함유되어 있는 유해성분을 제거한 정제
목초액을 제공하고, 인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한 건강기능식품의 원료 및
분으로 정제 목초액을 사용하기 위해서 정제 목초액에 대한 인체의 안전성 평가 와
제 목초액의 항산화 기능 성분 규명 및 정제 목초액의 인체의 항산화 기능 평가 결
를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

국내 학계 및 기업을 중심으로 다양한 건강 기능성 소재에 대한 연구가 수행되
있으나, 아직 대부분이 수입된 건강 기능성 원료에 의존하고 있어, 국내 기능성
품 산업이 국제 경쟁력을 가지기 위해서는 우리만의 고유한 기능성 원료를 개발하
외국의 기능성 원료를 방어 또는 대체할 우리만의 기능성 원료의 확보가 요구되고
다.

어떤 특정 건강 기능성 성분 또는 건강 기능성 물질이 아무리 건강에 유익한 기
이 있다고 하더라도 혼합, 추출, 정제, 농축등의 과정을 거쳐 식품으로 제조회 되
을 때 최종 제품내에서 그 기능성을 나타내는지는 모르는 일이다. 그러나 목초액
수목의 열분해를 통해서 얻은 열에 안정한 물질로 최종 제조회 되는 과정에서 기
성 성분의 소실이 없다.

목초액은 숲가마의 연기에서 채취한 산림자원이다. 목초액은 수목에 함유되어
는 셀룰로오즈나 리그닌등의 성분을 열로 분해하여 만들어지는 것으로, 같은 숲가
에서 생산되는 숯과 마찬가지로 현대사회에서는 결코 화려한 존재라고 말할수 없지
. 목초액에는 다양한 작용을 하는 유기성분이 200여종 이상이나 함유되어 있다. 이
한 목초액의 유기성분을 이용하여 의료 현장에서도 무좀이나 아토피 피부염외에 당
병, 간질환등에 목초액을 적용하려는 연구가 일본의 많은 전문가들 사이에서 진행
였다. 그러나 목초액에는 유효성분 뿐만 아니라 유해성분인 타르, 메탄올, 벤조피
, 페틸 콜란스텐등이 기준치 이상 함유되어 있어서,인체에 대한 안전성이 규명되지
않아 건강에 유익한 성분으로 인정을 받을 수 없었다. 또한 목초액에 함유되어있는
효성분들이 명확히 규명 및 분류되지 않아서, 목초액이 가지고 있는 기능성을 예측
인 할 수 없었다.

따라서 본 발명을 통해서 목초액의 유해성분을 제거한 정제 목초액의 인체 안전
을 확인하고, 정제 목초액의 항산화 기능 성분 규명 및 정제 목초액의 인체의 항산
기능 증진 평가를 통해서, 정제 목초액이 인체의 항산화 기능을 증진시키기 위한
강기능 식품의 원료 및 성분으로 사용가능하다는 것을 확인 하였다.

본 발명에 따르면, 사용된 정제 목초액의 인체 안전성 평가는 급성 독성 시험, 전 독성 시험, 아급성 독성 시험등의 독성 평가 방법들에 의해서 수행 되어졌다.

급성독성시험은 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 '의약품 등의 독성시험기준 및 국립보건안전연구원 '독성시험 표준작업 지침서'의 일반독성시험법에 따라서 수 이 되어졌다. 폐사율, 임상증상, 체중변화, 해부병리소견등에 걸쳐서 급성독성평가 시험이 수행되어 졌는데, 시험 전 기간을 통하여 암수 모두에서 정제 목초액의 경구 역시 폐사등함은 관찰되지 않았다. 또한 시험 전 기간을 통하여 암수 모두에서 정제 목초액의 경구투여시 본 시험물질에 의한다고 생각되는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았으며, 정제 목초액을 투여한 암수 모두에서 체중변화는 대조군의 체중변화와 의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 무여용량군간의 체중변화는 용량의존성을 나타 지 않는 것이 확인되었다.

이상과 같은 결과를 종합하여 시험물질인 정제 목초액은 마우스에 경구투여시 무런 급성독성을 나타내지 않았고 LD50 값은 투여 최대용량인 5,000mg/kg body weight 이상일 것으로 확인 되어졌다. 이 용량은 정제 목초액의 예상 1일 섭취용량의 0배에 달하는 용량으로 경구투여시 안전한 것으로 확인 되어졌다.

유전독성시험은 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 '의약품 등의 독성시험기준 및 국립보건안전연구원 '독성시험 표준작업 지침서' 의 유전독성시험법에 따라 수 이 되어졌다. 본 유전독성시험은 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험, 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험, 및 설치류의 골수세포를 이용한 핵시험으로 구성되었는데, 정제 목초액은 *S.typhimurium* TA1535, 1537, TA98, TA100을 이용한 복귀돌연변이시험에서 시험적용농도 62-5000ug/plate 범

에서 복귀등연변이군 유발하지 않음이 확인 되었고, 포유류 태양세포를 이용한염색 이상시험에서 시험적용농도 1.25-5mg/ml의 범위에서 염색체 이상을 유발하지 않음 확인하였다. 또한 설치류를 이용한 소핵시험에서 시험적용용량 1250 - 5000mg/kg 범위에서 소핵을 유발하지 않음을 나타내었다. 이상의 결과로부터 경제 목초액은 전 독성을 나타내지 않음이 확인되었다.

경제목초액의 경구투여에 의한 아급성 독성평가는 국립보건안전연구원 고시 제-3호 의약품등의 독성시험기준에 의해 시험물질을 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 g/kg/day의 량으로 ICR계 암수 마우스에 주6회 총 28일간 경구투여하였다.투여기간동안 사망동, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 최종 투여 후 육안적부검소견, 장기무제 경, 혈액학적,혈액생화학적검사 및 조직병리학적검사등을 실시하여 모두 특이한 병 이 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 경제 목초액의 무독성량은 0g/kg/day이상으로 확인되었다.

경제 목초액중에 항산화 기능 성분의 규명은 GC-MSD(HP 5890 GC, HP 5972 MSD) 이용하여 수행되어졌고,경제 목초액중에 항산화 기능 성분으로 구아이 알콜 guaiacol) 및 구아이 알콜 유사체 (Guaiacol Related) 와 시링골 (Syringol) 및 시링 유사체 (Syringol Related)을 항산화 기능성분으로 규명하였다.

DPPH(1,1-디페닐-2-피크릴히드라진)는 유해산소 (free radical)로 in vitro상에 천연물질의 항산화효과를 검색하는 방법으로 널리 이용되고 있다. 10% 경제 목초 은 DPPH를 82.66 ±.12를 제거하였으며, 5% 경제 목초액은 89.40 ±.81%, 1% 경제 목 액은 59.93 ±.22% 제거하여 경제 목초액이 유해산소인 DPPH를 소거하는 매우 우수 항산화 능력을 소유하고 있음이 확인되었다.

마우스(SD rat)간 이용한 항산화 효소 측정은 2주동안 정제 목초액을 투여한 후
일에 걸쳐 12시간 간격으로 bromobenzene(BB)을 마우스 복강에 주사하였다. BB 복
주사후 24시간 후에 쥐간 회생시켜 항산화 효소의 활성을 측정하였다. 1% 정제 목
액이 Glutathion-s-transferase 와 Epoxide hydroxylase등의 항산화 효소의 활성을
각각 8.41%, 125% 증가시켰으며, 1% 정제 목초액이 유리기인 MDA(Malondialdehyde),
(formaldehyde), AH(p-aminophenol)를 각각 36.8%, 18.5%, 34.04% 감소시켰다.

실시에 1: 정제 목초액의 급성독성 실험

다중실험에서 분양 받은 암수 각각 5-7주령의 ICR 마우스를 사용하였으며 동물
수 후 약 1주일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 실험에 사용하였다.실험동물
사육환경은 온도 25℃,습도 55-65%, 조도 300-500Lux로 12시간 자동 점·소등 장
가 설치되어있다. 동물은 순화 및 시험기간중에 polycarbonate cage에 5마리씩 넣
사육하였다. 사료는 삼양사의 고형사료를 , 물은 수돗물을 자유로이 공급하였다.

순화기간 중에 건강하다고 판단된 동물의 체중을 측정하여 평균체중에 가까운
체들이 골고루 들어가도록 무작위법으로 군 분리를 하였다. 각 군당 5마리로 하고
수 각각 6개의 시험군으로 나누었다. 시험 최고용량은 정제 목초액의 예상 1일 섭
용량(100mg/kg body weight)의 50배인 5000mg/kg으로 설정하였으며, 이 용량의 일
한 공비(0.5)로 모두 5개의 용량군과 1개의 대조군을 두었다.시험에 사용한 모든
험동물에 대해 투여 당일에는 투여후 6시간 동안 매시간 관찰하였으며, 투여 익일
터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태변화, 증독 증상 및 사망여부등 관찰하였

본 실험은 경제 목초액에 대한 경구 투여시 급성 독성의 정도를 파악함으로써
반 악리 및 약효 시험에서의 가용 약용량에 대한 정보를 제공하고 독성에 대한 기
자료를 도출함을 목적으로 실시하여 표1과 같은 결과를 얻었다.

표 1. 경제 목초액을 경구 투여한 마우스의 사망률 및 임상증상

성	투여량 (mg/kg)	동 물 수	시 간 (Hours)					투여일수 (Days)							투여일수 (Days)							사 망 율	임 상 소 견	
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			14
자 성	5000	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	0/5	이 상 없 음
	2500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이 상 없 음
	1250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이 상 없 음
	625	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이 상 없 음
	313	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이 상 없 음
	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

구분	투여량 (mg/kg)	동 환 수	시 간 (Hours)						투여일수 (Days)						투여일수 (Days)						사 망 율	임 상 소 견		
용 량 군	500	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	0/5	이상 없음
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이상 없음
	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이상 없음
	62.5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이상 없음
	31.3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이상 없음
	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	이상 없음

급성 경구 독성의 경우 경제 독초액은 5000mg/kg body weight의 용량에서 14일 안 치사등들이 관찰되지 않았다. 14일후 생존동물에 대한 부검을 실시한바, 특별한 3변 육안 소견이 없었으며, 투여 익일부터 14일간 어떠한 체중의 변화도 관찰되지 않았다. 이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때 시험물질인 경제 독초액은 경구 투여시 우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고 LD50 값은 투여 최대용량인 00mg/kg body weight 이상일 것으로 확인되어졌다.

실시예 2: 경제 독초액의 유전독성 실험

경제 독초액의 유전독성실험은 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 실험, 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 설치류의 골수세포를 이용한 핵시험으로 구성되었다.

1. *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험

시험에 사용한 균주인 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100은 국
보건안전연구원으로부터 분양을 받아 사용하였다. 분양 받은 균주는 Maron 및 Ames
883)의 방법에 따라 Histidine 요구성, Crystal violet 감수성, UV감수성,
picillin 내성, 자발복귀돌연변이수등의 유전자형을 확인하였다. 결과의 판정은 복
돌연변이 colony의 수가 용량 의존적으로 증가하고, 그 수가 음성대조군에 비해서
3 이상이거나 통계학적 유의성을 나타낼 경우에 양성으로 판정한다.

표 2. *S. typhimurium*을 이용한 정제목초액의 복귀돌연변이시험

물질명	농도 (ug/plate)	S-9 mix.	His ⁺ 복귀돌연변이 집락수/plate			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
2-NF	10	-	3464 ± 296			
9-AA	8	-				2864 ± 64
NaN3	0.5	-			456 ± 17	
MNNG	0.5	-		3688 ± 440		
정제목초액	0	-	35 ± 3	168 ± 3	24 ± 3	8 ± 2
	62	-	36 ± 6	164 ± 21	19 ± 2	10 ± 1
	185	-	40 ± 3	164 ± 17	23 ± 3	13 ± 1
	566	-	41 ± 3	178 ± 12	19 ± 4	13 ± 2
	1667	-	41 ± 3	156 ± 17	21 ± 3	19 ± 2
	5000	-	42 ± 5	181 ± 29	28 ± 3	14 ± 1
2-AF	2	+	2224 ± 192	3944 ± 440		
2-AA	2	+			160 ± 27	54 ± 1
정제목초액	0	+	38 ± 3	152 ± 11	19 ± 2	12 ± 1
	62	+	55 ± 9	150 ± 4	22 ± 5	13 ± 2
	185	+	50 ± 4	161 ± 6	17 ± 2	11 ± 1
	566	+	49 ± 4	160 ± 24	12 ± 4	12 ± 3
	1667	+	56 ± 6	165 ± 14	20 ± 5	11 ± 2
	5000	+	50 ± 3	159 ± 16	19 ± 5	14 ± 1

2-NF:2-nitrofluorene,9-AA:9-Aminoacridine,2-AF:2-Aminofluorene,2-AA:2-Amin
antharecene,MNNG:N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

위의 결과(표 2.)를 통해서 정제 목초액은 *S.typhimurium* TA1535, TA1537, 98, TA100을 이용한 복귀돌연변이시험에서 시험적용농도 62 - 5000ug /plate 범위서 복귀 돌연변이간 유발하지 않음을 확인하였다.

2. 포유류의 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험

본 시험에서 사용한 Chinese hamster lung fibroblast (CHL)는 국립보건안전연구원으로부터 분양 받았다. 한 농도당 4개의 Well을 할당하여 시험물질을 5단계까지 농도로 10배씩 희석한 후 배양액에 가하여 처리하고 6번째 Well은 무처리 대조군로 하였다.

- 음 성 (-) : 5% 미만
- 의양성 (±) : 5% 이상 10% 미만
- 양 성 (+) : 10% 이상

표 3. CHL 세포주를 이용한 정제 목초액의 염색체 이상시험

처리	농도 (ug/ml)	S-9 Mix	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	cor	총 합
PBS	-	-	1						99	100
정제목초액	5000	-	1						99	100
	2500	-	2						98	100
	1250	-							100	100
MWC	0.2	-	13	5	14	3	1		70	100
PBS	-	+	1						99	100
정제목초액	5000	+	1	1					98	100
	2500	+							100	100
	1250	+							100	100
B(a)p	50	+	11	6	2	3	1		78	100

PBS : Phosphate buffered saline, MWC : Mitomycin C, B(a)p : nzo(a)pyrene, ctg : chromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid

change, csg : chromosome gap, csb : chromosome breakage, cse : chromosome

change, nor : normal

위의 결과(표 3.)를 통해서 경제 독초액은 포유류 배양세포를 이용한 염색체이 시험에서 시험적용농도 1.25 - 5mg/ml 범위에서 염색체 이상을 유발하지 않음을 인하였다.

3. 설치류 골수세포를 이용한 소핵시험

다중시험에서 분양 받은 ICR 마우스를 사용하였으며, 동물 입수후 약 1주일간의 화기간을 거쳐 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도 25℃, 습도 55±5%, 조도 300~500 Lux로 12시간 자동 점·소등 장치가 설치되었다. 동물 순화 및 시험 기간 중에 polycarbonate cage에 6마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 양사의 고품사료를, 물은 수돗물을 자유로이 공급하였다. 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 드는 동물들을 무작위로 각 시험군에 6마리씩 배분하고, 각 시험군의 식별은 cage별 tag표시법을 이용하였다.

음성대조물질로는 시험물질의 용매로 사용한 증류수를 경구투여 하였고, 양성 조물질로는 Mitomycin C를 증류수에 녹여 복강내 투여하였다. 본 시험에서의 시험 물질 투여량은 경제 독초액의 급성독성시험 결과를 근거로 설정 하였으며 10ml/kg으로 시험물질의 실제적인 투여경로에 맞추어 경구투여하고 채취시간을 24시간, 48시간으로 하여 골수도말표본을 제작하고 광학현미경 (×1000) 하에서 1000개의 다염성적혈에서 소핵출현 빈도수를 계수하여 소핵출현 빈도수가 가장 많은 시간을 표본제작시

표 4. 음성마우스를 이용한 정제 목초액의 소핵시험

시험물질	투여량 (mg/kg)	마우스 (수)	시료채취시간 (hr)	MNPCE % (Mean ± SD)	% FCE/(FCE+NCE) (Mean ± SD)
증류수	0	6	24	0.20±0.06	44.97±1.18
정제목초액	500	6	24	0.16±0.08	43.40±2.20
	2500	6	24	0.14±0.08	43.94±1.76
	1250	6	24	0.16±0.08	45.57±1.44
MNC	0.05	6	24	1.12±0.03	44.57±1.82

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE : Polychromatic erythrocytes, NCE : normochromatic erythrocytes

위의 결과(표 4.)를 통해서 정제 목초액은 선치류를 이용한 소핵시험에서 시험용농도 1250 ~ 5000 mg/kg 범위에서 소핵을 유발하지 않음을 나타내었다.

실시예 3: 정제 목초액의 아급성 독성 시험

정제 목초액의 경구투여에 의한 아급성 독성평가는 국립보건안전연구원 고시 제 4-3호 (1994. 4. 14 제정) 의약품 등의 독성시험기준에 의해 수행되어졌다.

시험동물은 (주)대한실험동물센터의 특정병원체부재 (SPF) ICR계 마우스를 분양아 약 1주일간 순화시킨후 건강한 동물들 선택하여 온도 23±3℃, 습도 50 ±5%, 배기-15회/hr, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 150-300Lux의 환경조건에서 폴리카보네이트 사육상자에 넣어 실험하였으며, 시험기간동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 1℃에서 15분간 멸균한 CLEA사의 펄프깔짚을 사용하였다. 물 섭취는 멸균 수도수를 시험동물에 자유로이 공급하였다.

순화 사육기간 동안 일반증상 관찰등을 시행하여 정상적인 동물을 선별하고, 무위 추출법에 따라 시험동물의 군분리를 시행하였다. 각군의 평균 체중에 대한 군간

이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 아급성 독성 예비실험 결과값 통하여 4단계의 증비용량으로 주사용 증류수군 대조군으로하고, 시험물질투군은 최고용량군, 고용량군, 중용량군 및 저용량군으로 설정하였다. 최고용량은 예 1일 섭취용량 (50mg/kg)의 100배인 5.0g/kg으로 설정하였으며, 1일 1회 주 6회 총 8일간 경구투여하였다. 각 시험군마다 시험제는 아래와 같다.

표 5. 군분리 및 적정투여용량의 설정

시험군	투여 용량 (g/kg/day)	투여 역량 (ml/kg/day)	시험제(마리)	
			수컷	암컷
대조군	0	10	12	11
저용량군	0.5	10	12	13
중용량군	1.0	10	12	12
고용량군	2.5	10	15	12
최고용량군	5.0	10	11	10

투여기간동안 사망동물, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 최종투여 후 육적부검소견, 장기무게측정, 혈액학적·혈액생화학적검사와 조직병리학적검사를 실시하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

표 6. 정제 목초액을 경구 투여한 마우스의 사망률,임상증상,내부장기증상

성	투여량 (g/kg/day)	시험제 (마리)	7	14	21	28
공	0	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
	0.5	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
	1.0	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
	2.5	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
	5.0	11/11	11/11	11/11	11/11	11/11
자	0	11/11	11/11	11/11	11/11	11/11
	0.5	13/13	13/13	13/13	13/13	13/13
	1.0	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
	2.5	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
	5.0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

성	투여량 (g/kg/day)	임상증상	1	2	3	4	5	7	10	14	17	21	28
			(날짜수)										
웅 성	0	이상없음	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	0.5	이상없음	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1.0	이상없음	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	2.5	이상없음	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	5.0	이상없음	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
자 성	0	이상없음	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	0.5	이상없음	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	1.0	이상없음	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	2.5	이상없음	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5.0	이상없음	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

성	그룹	투여량 (g/kg/day)				
		0	0.5	1.0	2.5	5.0
웅 성	간					
	시험제(마리수)	12	12	12	15	11
	이상없음	12	12	12	15	11
	신장					
	시험제(마리수)	12	12	12	15	11
	이상없음	12	12	12	15	11
	심장					
	시험제(마리수)	12	12	12	12	12
	이상없음	12	12	12	12	12
	비장					
자 성	간					
	시험제(마리수)	11	13	12	12	10
	이상없음	11	13	12	12	10
	신장					
	시험제(마리수)	11	13	12	12	10
	이상없음	11	13	12	12	10
	심장					
	시험제(마리수)	11	13	12	12	10
	이상없음	11	13	12	12	10
	비장					
자 성	시험제(마리수)	11	13	12	12	10
	이상없음	11	13	12	12	10

O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)
O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)
O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)

O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)
O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)

O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)
O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)
O=C1C=CC(=O)C=C1 (100%)

GUALACOL RELATED

GUALACOL 4-METHYL 4-ETHYL 4-PROPYL

VANILLIN 4-(2-PROPYLOXY)-
VANILLINOL 4-(4-ETHOXYOXY)-
VANILLINOL

1,1'-DIOXY- 1-ISOETHYL- 2'-ISOETHYL- 4'-ETHYL-
VANILLINOL VANILLINOL VANILLINOL VANILLINOL

SYRINGOL RELATED

SYRINGOL, 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL

SYRINGOL 1 1-METHYL 4-METHYL 1,4-DI-METHYL

SYRINGOL 2 1-METHYL 4-METHYL 1,4-DI-METHYL

SYRINGOL 1,1-DI-METHYL 4,4-DI-METHOXYSYRINGOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL

SYRINGOL 1,1-DI-METHYL 4,4-DI-METHOXYSYRINGOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL

1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 2,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL

SYRINGOL 1,1-DI-METHYL 4,4-DI-METHOXYSYRINGOL

SYRINGOL 1,1-DI-METHYL 4,4-DI-METHOXYSYRINGOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL

(I) 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL

SYRINGOL 1,1-DI-METHYL 4,4-DI-METHOXYSYRINGOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL 1,4-DI-METHOXYSYRINGOL 4-HYDROXY-3,5-DIMETHOXYBENZYL ALCOHOL

기는 라디칼 소거활성(scavenging activity SC50)으로 표시할수 있으며, SC50은
 PH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 나타낸다.

표 7. 정제 목초액의 유효산소(CPPH) 제거율

농 도(%)	0.1	1	5	10
유효 산소 제거율 (%)				
정제 목초액	14.07±4.88	59.93±8.22	89.40±4.81	92.66±5.12

(2) 항산화 효소 합성도 측정 및 Malondialdehyde(MDA) , Formaldehyde(AD) ,
 aminophnol(AH)의 함량 측정
 마우스(SD rat)를 대상으로 2주동안 정제 목초액을 투여 한 후, 2일에 걸쳐 12
 간 간격으로 bromobenzene(BB)을 복강 주사 하였다.BB 복강주사후 24시간 후에 쥐
 희생시켜 항산화기전을 연구하였다.

표 8. 정제 목초액의 항산화 효소 측정

항산화효소	실험군	BB(㎍/kg)	Dose(㎍/kg)	Glutathion S-transferase*
Glutathion S-transferase	정상군	-	-	186.4±17.7
	대조군	460	-	143.8±7.68
	1% 정제목초액	460	100	155.9±8.61
Epoxide hydroxylase	정상군	-	-	14.80±0.60
	대조군	460	-	4.16±0.13
	1%정제목초액	460	100	9.87±0.36

* : conjugated 2,4-nitrobenzene-gluththione nmole/mg protein/min.
 BB : bromobenzene.
 Glutathione S-transferase는 생성된 glutathione radical을 해독하여 조직의
 상을 보호해주는 역할을 수행하는 항산화 효소이고 epoxide hydroxylase는 반

성이 높은 epoxide를 안정하고 반응성이 거의 없는 dihydrodiol product로 수화하
 것을 촉매하는 항산화 효소이다. 위의 결과(표 8.)로부터 1% 정제 목초액은
 (bromobenzene)로 항산화 활성이 감소된 Glutathione-S-transferase와 Epoxide
 drolase의 활성을 각각 8.41%, 125.1% 증가시켰다.

MDA는 지질의 과산화물을 총체적으로 나타내는 물질로 MDA의 생성증가는 유해산
 와 같은 유리기의 증가를 의미하며, MDA의 증가에 의하여 조직의 손상이 증가하게
 다. 또한 Formaldehyde (AD)와 P-aminophnal (AH)는 간손상유발물질에 의하여 간의
 crosome에서 생성되는 유리기와 비슷한 작용을 하는 대사산물로 간손상을 유발하게
 1다.

표 9. MDA, AD, AH 함량 측정

실험군	EB(g/kg)	Dose(mg/kg)	MDA nmole/g of tissue	
정상군	-	-	18.0±1.18	
대조군	460	-	56.4±1.77	
1% 정제목초액	460	100	41.2±8.78	
실험군	EB(g/kg)	Dose(mg/kg)	AD	AH
정상군	-	-	4.17±0.24	0.64±0.090
대조군	460	-	9.34±0.37	1.26±0.087
1% 정제목초액	460	100	7.88±0.28	0.94±0.073

AD: formaldehyde nmole/mg protein/min

AH: p-aminophnal nmole/mg protein/min BB: bromobenzene

위의 결과(표 9.)로부터 1% 정제 목초액이 BB(bromobenzene)로 증가된 MDA ,AD,
 함량을 각각 36.89%, 18.52%, 46.87%로 감소시켰다.

발명의 효과]

상술한 바와 같이, 본 발명은 침엽수, 활엽수, 대나무등의 독제를 열분해시켜 얻인 기초 목초액으로부터 등록번호 100212472 '기초 목초액에 함유된 유해성분의 제거 방법'에 따라 유해성분을 제거한 정제 목초액을 국립보건안전연구원 고시 제-3호 '의약품 등의 독성시험기준' 및 국립보건안전연구원'독성시험 표준작업 지침'의 독성 시험법에 따라서 정제 목초액의 인체 안전성을 확인하였고, 정제 목초액 항산화 기능 성분을 규명함과 동시에 정제 목초액의 항산화 기능 평가들 통해서 정제 목초액의 우수한 항산화 능력을 확인함으로써,정제 목초액이 인체의 항산화 기을 증진 시키기 위한 건강기능식품의 원료 및 성분으로 매우 유용하게 사용될 수 있다는 것을 확인 하였다.

【특허청구범위】

【구항 1】

침엽수, 활엽수, 대나무 등의 기초 목초액으로부터 유해성분을 제거한 정제 목
액을 인체의 항산화 기능을 개선시키기 위한 건강기능식품의 원료 및 성분으로 사
하는 것을 목적으로 하는 건강 기능 식품.

【구항 2】

구아이알콜 (Guaiacol) 과 구아이알콜 유사체 (Guaiacol Related) 그리고 시링골
yringol) 과 시링골 유사체 (Syringol Related)를 함유한 정제 목초액을 인체의 항
화 기능을 개선시키기 위한 건강 기능 식품의 원료 및 성분으로 사용하는 것.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.